

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGI Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C12Q 1/68, C07K 14/47, C12N 15/12, 15/10, 5/10, 15/81, 15/83, G01N 33/68 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34511

A2

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

15. Juni 2000 (15.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/09234

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. November 1999

(27.11.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 56 261.6

7. Dezember 1998 (07.12.98)

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main

(72) Erfinder: PERAUS, Gisela; Agnes-Bernauer-Strasse 15. D-80687 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: $A\beta$ -PEPTIDE SCREENING ASSAY

(54) Bezeichnung: $A\beta$ -PEPTID SCREENING ASSAY

(57) Abstract

The invention relates to a method for determining γ -secretase activity, to individual components of the method and the application of the method. The invention provides a novel method for determining γ -secretase activity and for detecting γ -secretase; particular embodiments of the method relate to methods for identifying a γ -secretase or a cDNA which codes for a γ -secretase and methods for identifying substances which can inhibit the activity of a γ -secretase. Substances of this type are particularly significant since they can be used, e.g. as pharmaceutical active agents, e.g. for treating Alzheimer's disease.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der 7-Sekretase-Aktivität, einzelne Komponenten des Verfahrens und die Anwendung des Verfahrens. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neues Verfahren zur Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität und zum Nachweis von \u03c4-Sekretase; besondere Ausführungsformen des Verfahrens betreffen einerseits Verfahren zur Identifizierung einer γ -Sekretase bzw. einer cDNA, die für eine γ -Sekretase kodiert und andererseits Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer \u03c4-Sekretase inhibieren können. Solchen Substanzen kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie z.B. als pharmazeutische Wirkstoffe, z.B. zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, verwendet werden können.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

					•		
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AТ	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige Jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	00	Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		Ziiiiollowc
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur .		

PCT/EP99/09234

Aβ-PEPTID SCREENING ASSAY :

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der γ -Sekretase Aktivität, einzelne Komponenten des Verfahrens und die Anwendung des Verfahrens.

1

Bei der Alzheimer'schen Krankheit (Morbus Alzheimer) handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung des Gehirns, die auf zellulärer Ebene mit einem massiven Verlust von Neuronen im limbischen System und im cerebralen Cortex einher geht. Auf molekularer Ebene lassen sich in den betroffenen Gehirnarealen Proteinablagerungen, sogenannte Plaques, nachweisen, die ein wesentliches Charakteristikum der Alzheimer'schen Krankheit darstellen. Das am häufigsten in diesen Plaques vorkommende Protein ist ein 40 bis 42 Aminosäuren großes Peptid, das als Aß-Peptid bezeichnet wird. Bei diesem Peptid handelt es sich um ein Spaltprodukt eines wesentlich größeren Proteins von 695 bis 770 Aminosäuren, dem sogenannten Amyloidvorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein; APP).

APP ist ein integrales Transmembranprotein, das die Lipiddoppelschicht einmal durchquert. Der weitaus größte Teil des Proteins liegt extrazellulär, während die kürzere C-terminale Domäne in das Cytosol gerichtet ist (Figur 1). Das Aß-Peptid ist in Figur 1 dunkelgrau dargestellt. Etwa zwei Drittel des Aß-Peptids stammen aus der extrazellulären Domäne und etwa ein Drittel aus der Transmembrandomäne von APP.

Neben dem membranständigen APP läßt sich eine sekretierte Form des Amyloid Vorläuferproteins nachweisen, die aus der großen Ektodomäne des APPs besteht und als APPsec ("sekretiertes APP") bezeichnet wird. APPsec entsteht aus APP durch proteolytische Spaltung, die durch die α -Sekretase erfolgt. Die proteolytische Spaltung findet an einer Stelle der Aminosäuresequenz von APP statt, die innerhalb der Aminosäuresequenz des Aß-Peptids liegt (nach Aminosäurerest 16 des Aß-Peptids). Eine Proteolyse von APP durch die α -Sekretase schließt damit die Bildung des Aß-Peptids aus.

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Das Aß-Peptid kann also nur auf einem alternativen Prozessierungsweg aus APP gebildet werden. Es wird postuliert, daß an diesem Prozessierungsweg zwei weitere Proteasen beteiligt sind, wobei die eine Protease, die als ß-Sekretase bezeichnet wird, am N-Terminus des Aß-Peptids im APP schneidet und die zweite Protease, die als γ -Sekretase bezeichnet wird, den C-Terminus des Aß-Peptids freisetzt (Kang, J. et al., Nature, 325, 733) (Figur 1).

Bisher konnte keine der drei Sekretasen bzw. Proteasen (α-Sekretase, ß-Sekretase, γ-Sekretase) identifiziert werden. Die Kenntnis der Sekretasen ist jedoch von großem Interesse, insbesondere im Rahmen von Untersuchungen zur Alzheimer'schen Krankheit und zur Identifizierung der beteiligten Proteine, die dann wiederum als Targets in weiterführenden Studien eingesetzt werden können. Zum einen könnte die Inhibition der ß- und insbesondere der γ-Sekretase zu einer Reduktion der Aß-Produktion führen, zum anderen könnte eine Aktivierung der α-Sekretase die Prozessierung von APP in APPsec steigern und würde damit gleichzeitig die Entstehung des Aß-Peptids reduzieren. Ein transgener C. elegans, der im Rahmen solcher Untersuchungen Anwendung finden wird, ist in der unveröffentlichten Deutschen Patentanmeldung mit dem Aktenzeichen 198 49 073.9 beschrieben.

Es gibt viele Hinweise darauf, daß das Aß-Peptid bei dem Auftreten der Alzheimer schen Krankheit ein entscheidender Faktor ist. Unter anderem wird eine Neurotoxizität von Aß-Fibrillen in Zellkultur postuliert (Yankner, B.A. et al., (1990) Proc Natl Acad Sci USA,87, 9020). Auch tritt bei Patienten mit Down Syndrom, bei denen APP in einer zusätzlichen Kopie vorkommt die für den Morbus Alzheimer charakteristische Neuropathologie bereits im Alter von 30 Jahren auf. Dabei wird angenommen, daß der Überexpression von APP eine erhöhte Umsetzung in das Aß-Peptid folgt (Rumble, B. et al., (1989), N. Engl. J. Med., 320, 1446).
 Den vielleicht stärksten Hinweis auf die zentrale Rolle des Aß-Peptids stellen die familiären Formen der Alzheimer schen Krankheit dar. Hier finden sich Mutationen im APP-Gen um den Bereich der ß- und γ-Sekretaseschnittstellen oder in zwei weiteren AD-assoziierten Genen (Presenilinen), die in Zellkultur zu einer

WO 00/34

15

30

wesentlichen Erhöhung der Aß-Produktion führen (Scheuner, D. et al., (1996), Nature Medicine, 2, 864).

3

Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, daß APP bei seiner Prozessierung in das Aß-Peptid zunächst durch die ß-Sekretase geschnitten wird um im Anschluß daran als Substrat für die γ-Sekretase zu dienen (Maruyama, K. Y. et al., (1994) Biochem. Biophys Res Commun, 202, 1517; Estus, S. et al., (1992), Science, 255, 726). Der γ-Sekretase kommt daher bei der Entstehung des Aß-Peptids eine entscheidende Rolle zu. Als Nachweis für die Aktivität der γ-Sekretase dient üblicherweise die Detektion des Aß-Peptids die sich allerdings häufig schwierig gestaltet.

Ein wesentlicher Grund hierfür liegt darin, daß nur ein geringer Teil von APP in das Aß-Peptid umgesetzt wird (Simons M, et al., Neurosci (1996) 1;16(3):899-908). Darüber hinaus ist das Aß-Peptid ein nur sehr kleines Bruchfragment von etwa 4 kDa und besitzt aufgrund seines hydrophoben Charakters eine starke Tendenz zur Selbstaggregation so daß es unter physiologischen Bedingungen leicht ausfällt (Hilbich, C. et al., (1991) J. Mol. Biol., 218, 149).

Der Nachweis des Aß-Peptids in eukaryotischen Zellen erfolgt über immunobiologische Methoden wie z.B. ELISA, Immunpräzipitation und Western-Blotting (Suzuki, N. et al., Science 1994, 27, 264(5163) 1336; Haass, C. et al., (1992) Nature, 359, 322). Diese Verfahren sind relativ aufwendig, da sie die Inkubation mit entsprechenden Antikörpern implizieren und einen Aufschluß der verwendeten Zellen aus Zellkultur oder Modellorganismen (u.a. *C. elegans*) erfordern.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neues Verfahren zur Bestimmung der γ-Sekretase Aktivität und zum Nachweis von γ-Sekretase; besondere Ausführungsformen des Verfahrens betreffen einerseits Verfahren zur Identifizierung einer γ-Sekretase bzw. einer cDNA, die für eine γ-Sekretase kodiert und andererseits Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer

y-Sekretase inhibieren können. Solchen Substanzen kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie z.B. als pharmazeutische Wirkstoffe, z.B. zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, verwendet werden können.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Y-Sekretase, wobei
 - 1. ein Transgen bereitgestellt bzw. verwendet wird, das ein Fusionsprotein kodiert und folgende Bestandteile enthält:
 - a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die
- 10 Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
 - b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert,
 - c) einen Promotor und
- d) gegebenenfalls weitere kodierende und/oder nicht-kodierende Nukleotidsequenzen;
 - 2. dieses Transgen in eine Zelle eingebracht und das Fusionsprotein exprimiert wird;
- 3. das Fusionsprotein durch in der Zelle vorliegende Y-Sekretase innerhalb der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 gespalten wird, wodurch ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, gebildet werden und
 - 4. das erste Teilprotein und/oder das zweite Teilprotein detektiert werden.

25

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Nachweise der Aktivität von y-Sekretase, wobei

- 1. ein Transgen bereitgestellt bzw. verwendet wird, das ein Fusionsprotein kodiert und folgende Bestandteile enthält:
- a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die
 Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,



- b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert,
- c) einen Promotor und
- d) gegebenenfalls weitere kodierende und/oder nicht-kodierende Nukleotidsequenzen;
- 2. dieses Transgen in eine Zelle eingebracht und das Fusionsprotein exprimiert wird;
- 3. das Fusionsprotein durch in der Zelle vorliegende _Y-Sekretase innerhalb der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 gespalten wird, wodurch ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, gebildet werden;
- 4. die Menge an zweitem Teilprotein bestimmt und aus der Menge an gebildetem zweitem Teilprotein die Aktivität der Y-Sekretase bestimmt wird.

20

10

- Die Verfahren ("Aß-Peptid Screening Assay", "γ-Sekretase Assay") sind zum *in vivo* Nachweis einer γ-Sekretase bzw. der Aktivität einer γ-Sekretase geeignet, wobei die Verfahren universell, auch z.B. im Hochdurchsatzscreening ("HTS") eingesetzt werden können. Die Verfahren weisen die oben erwähnten Nachteile herkömmlicher Nachweisverfahren nicht auf, insbesondere sind aufwendige Isolierungs- und Detektionsschritte nicht notwendig. Grundlage der Verfahren ist, daß das Cterminale APP-Fragment, das durch die γ-Sekretase in zwei Fragmente ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO.
- 3) enthält geschnitten wird, wobei das zweite Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, in das Cytosol der Zelle diffundiert (Figur 2). Im Cytosol einer Zelle kann dieses zweite Teilprotein, z.B. mit Hilfe eines Reportergens, leicht detektiert werden; es dient als Nachweis für eine γ-Sekretase bzw. die Aktivität einer γ-Sekretase. Die γ-Sekretaseschnittstelle ist in der Transmembrandomäne des APP lokalisiert (Kang, J. et al., (1987) Nature, 325, 733). Die APP-Transmembrandomäne hat die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV40 IA42 TVIVITLVML. Die γ-Sekretase schneidet nach V40, A42 oder T43. Im Gegensatz



dazu wird das Aß-Peptid, das von eukaryotischen Zelle in Zellkultur produziert wird, in den Mediumüberstand sekretiert.

Mit Hilfe eines geeigneten Reportersystems kann die Freisetzung des zweiten Teilproteins die Expression eines Reporterproteins aktivieren, das in eukaryotischen Zellen detektiert werden kann. Durch den Nachweis des Reporterproteins kann nachgewiesen werden, daß ein γ-Sekretaseschnitt im APP stattgefunden hat. Dadurch kann die γ-Sekretase bzw. die Aktivität der γ-Sekretase qualitativ und/oder quantitativ bestimmt werden.

10

20

Die Bestandteile des Verfahrens können wie folgt näher charakterisiert werden:

Die erste Nukleotidsequenz kodiert für ein Amyloid Vorläuferprotein (APP) oder einen Teil davon. Vorzugsweise kodiert die erste Nukleotidsequenz für ein Protein, das die Aminosäuresequenz (SEQ ID NO. 4) enthält; SEQ ID NO. 4 enthält SEQ ID NO. 1.

Die zweite Nukleotidsequenz kodiert für ein Signalpeptid, vorzugsweise für das Signalpeptid von APP (nachfolgend "SP" abgekürzt). Das Signalpeptid enthält beispielsweise die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5.

Als Promotor kann ein regulierbarer oder ein konstitutiver Promotor verwendet werden. Der Promotor kann beispielsweise für die Expression in Säugetierzellen, in C. elegans, in Hefe oder in Drosophila geeignet sein. Als Promotoren für Säugetierzellen sind z.B. der CMV (z.B: Clontech, Heidelberg, Deutschland), HSV TK (z.B. Clontech), RSV (z.B. Invitrogen, NV Leek, Niederlande), SV40 (z.B. Clontech) und LTR (z.B. Clontech) geeignet. Als Promotoren für C. elegans können z.B. unc119, unc54, hsp16-2, G₀A1 und sel-12 verwendet werden. Für die Expression in Hefe sind die Promotoren ADH1 (konstitutiv) (Vlckova et al. (1994) Gene, 25(5), 472-4), Gal1 (konditionell induzierbar) (Selleck et al. (1987) Nature 325, 173-7), MET3 (konditionell) (Cherest et al. (1987) Mol Gen Genet 210, 307-13) und



Met 25 geeignet. In Drosophila können z.B. die Promotoren MT (Metallothionin) (z.B. Invitrogen), Ac5 (Invitrogen) oder Ds47 (Invitrogen) verwendet werden.

Vorzugsweise wird in dem Verfahren eine eukaryotische Zelle eingesetzt,

beispielsweise eine humane Zelle oder eine nicht-humane Zelle, z.B. Affe, Hamster,
Maus, Drosophila Zebrafisch oder Hefe. Beispielsweise kann eine HeLa, 293, H4,
SH-SY5Y, H9, Cos, CHO, N2A, SL-2 oder Saccharomyces cerevisiae Zelle
eingesetzt werden. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird eine C.
elegans Zelle eingesetzt. Die Zelle kann Bestandteil eines transgenen, nichthumanen Tieres sein. In einer besonderen Ausführungsform kann die transgene
Zelle Bestandteil eines transgenen C. elegans sein. Insbesondere betrifft die
Erfindung Verfahren, bei denen Hefezellen, z.B. vom Stamm MAV203 (Life
Technologies, Rockville, MD, USA) oder EGY 48 (OriGene Technologies, Inc.
Rockville, MD, USA), verwendet werden.

15

20

Das Transgen kodiert für ein Fusionsprotein; dies setzt sich zusammen aus den Teilproteinen die durch die erste und die zweite Nukleotidsequenz und gegebenenfalls weitere Nukleotidsequenzen kodiert werden. Das Fusionsprotein enthält also das erste Teilprotein und das zweite Teilprotein und ggf. ein weiteres Teilprotein. Das Fusionsprotein hat beispielsweise die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 6.

Insbesondere kann in dem Verfahren ein Transgen eingesetzt werden, das die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 8 hat. In besonderes bevorzugten

Ausführungsformen des Verfahrens liegt das Transgen in einem Vektor vor. Der rekombinante Vektor kann die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 9 haben. Diese spezielle Ausführungsform der Erfindung wird auch als SP-C100-Gal 4-VP16 System bezeichnet. Dabei wird ein Fusionsprotein bestehend aus dem Signalpeptid von APP, dem C100 Fragment von APP, Gal4 und VP16 exprimiert. Dieses in der Transmembrandomäne lokalisierte Protein wird innerhalb des C100 Fragments gespalten und das zweite Teilprotein, d.h. der Teil des Fusionsproteins, der einen



Teil des C100 Fragments, Gal4 und VP16 enthält wird mit Hilfe eines Reporterplasmids nachgewiesen.

Neben dem Transgen Konstrukt SPC100-Gal4-VP16 sind auch andere
Reporterkonstrukte denkbar, bei denen z.B. die transkriptionsaktivierende Domäne zwischen die Transmembrandomäne und cytosolische Domäne von SPC100 oder ein Tag (z.B. MYC, FLAG) an den N- und C-Terminus und zwischen die Transmembran- und die cytosolische Domäne von SPC100 eingefügt sein könnte.

- Die weitere kodierende Nukleotidsequenz kann beispielsweise für ein Protein 10 kodieren, das zur Detektion des zweiten Teilproteins verwendet werden kann. Vorzugsweise ist die weitere kodierende Nukleotidsequenz deshalb am 3'-Ende der ersten Nukleotidsequenz lokalisiert. Die weitere kodierende Nukleotidsequenz kodiert beispielsweise für ein chimeres Protein oder ein anderes Protein, das aus mehreren Domänen aufgebaut ist, z.B. ein Protein das eine DNA-bindende Domäne 15 und eine transkriptionsaktivierende Domäne enthält. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung kodiert die weitere kodierende Nukleotidsequenz für ein Protein, das aus einer Gal4-bindenden Domäne und aus der Transkriptionsaktivierenden Domäne von VP16 besteht (Gal4-VP16), vorzugsweise hat das 20 weitere Teilprotein dann die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7. In Hefezellen kann das weitere Teilprotein auch eine LexA-bindende Domäne enthalten (z.B. Lex A-VP16). Dieses weitere Teilprotein ist insbesondere für Verfahren geeignet, in denen Zellen des Hefestammes EGY48 verwendet werden.
- Insbesondere betrifft die Erfindung Verfahren, in denen Zellen verwendet werden, die mit einem Reporterplasmid co-transfiziert sind. Das Reporterplasmid enthält ein Reportergen unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors. Beispielsweise kann das Reportergen für GFP und dessen Derivate, z.B. EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), EBFP, EYFP, d2EGFP, GFPuv oder Luciferase (z.B. Promega, Mannheim, Deutschland), CAT (z.B. Promega), SEAP (z.B. Clontech), ßGal (z.B. Clontech) oder Apoptose induzierende Faktoren, z.B. Fas, TNF-R1, death domain und Homologe (Tartaglia et al. (1993) Cell 74, 845-53), ced3, ced4, ced9 kodieren.



Das Reporterplasmid kann als regulierbarer Promotor z.B. einen Minimalpromotor von HIV, vom CD4-Promotor oder den mec7 Promotor enthalten. Die Wahl des geeigneten regulierbaren Promotor hängt von der verwendeten transkriptionsaktivierenden Domäne ab.

5

10

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Durchführung des Verfahrens, wobei als Zellen Hefezellen verwendet werden. Als Alternative für den Hefe-Expressionsvektor pDBTRP (Life Technologies Inc.) (SEQ ID NO.: 11) in den in einer besonderen Ausführungsform der MET-25-Promotor eingesetzt wurde (siehe SEQ ID NO.: 12) können eine Vielzahl anderer Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren (z.B. der induzierbare Gal1-Promotor und MET-25-Promotor oder der konstitutiv aktive ADH1-Promotor) und unterschiedlichen Selektionsmarkern (ADE, LEU, TRP, HIS, LYS, PHE) ausgewählt werden.

- 15 Eine besondere Ausführungsform betrifft die Verwendung von Hefezellen, die Gal4oder LexA-induzierbare Reportergene stabil im Genom integriert oder extrachromosomal vorliegend enthalten.
 - Vorzugsweise werden für diese Ausführungsformen Hefen der Stämme MaV203 (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) oder EGY48 (Origene Technologies, Inc.
- 20 Rockville, MD, U.S.A.) verwendet.

Eine besondere Ausführungsform der Verfahren betrifft die Verwendung einer Zelle, die zusätzlich mit einem weiteren rekombinanten Vektor transfiziert wurde.

Vorzugsweise hat die Zelle, die für diese Ausführungsformen verwendet wird,

normalerweise keine oder kaum endogene y-Sekretase bzw. endogene y-Sekretase Aktivtät ist mit den oben genannten Verfahren nicht nachweisbar. Diese Zelle kann mit einem weiteren Vektor transformiert worden, in dem eine Nukleotidsequenz – vorzugsweise eine cDNA - enthalten ist, die für eine y-Sekretase kodiert.

Beispielsweise kann eine cDNA Bank eingesetzt werden. Diese Ausführungsform des Verfahrens kann dann u.a. dazu verwendet werden, eine y-Sekretase bzw. eine cDNA, die für eine y-Sekretase kodiert, zu identifizieren. cDNA-Banken, die nach

einer γ-Sekretase durchsucht werden können, können aus Zellen oder Geweben



hergestellt werden, z.B. B-Zellen, Neuronen, Gliazellen, Hippocampus, Gesamtgehirn, Plazenta, Niere. Vorzugsweise wird die cDNA aus menschlichen Zellen bzw. menschlichen Geweben aber auch aus anderen Organismen (z.B. Hamster, Ratte, Maus, Hund, Affe) hergestellt.

5

Bei Zellen, die ohne Transfektion mit einer cDNA Bank keine, nach Transfektion mit einer cDNA Bank aber eine γ -Sekretase Aktivität zeigen, kann die in der Zelle vorliegende cDNA für eine γ -Sekretase kodieren. Aus Zellen die dieses Verhalten zeigen, kann diese cDNA nach bekannten Verfahren isoliert und verifiziert werden.

10

15

20

30

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Transgen, das für ein Fusionsprotein kodiert und folgende Bestandteile enthält:

- a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
- b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert,
- c) einen Promotor und
- d) mindestens eine weitere Nukleotidsequenz am 3'-Ende der ersten Nukleotidsequenz, die für eine DNA-bindende Domäne und für eine Transkriptions-aktivierende Domäne kodiert.

Vorzugsweise kodiert die erste Nukleotidsequenz für APP oder einen Teil von APP. Das Transgen kann beispielsweise die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 8 haben.

Das Transgen kann in einem Vektor vorliegen. Dieser kann beispielsweise die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 9 haben.

Das Verfahren betrifft die Verwendung eines Transgens und/oder eines Vektors zur Herstellung einer transgenen Zelle, wobei die Zelle Bestandteil eines nicht-humanen Organismus sein kann. Beispielsweise kann das Transgens und/oder der Vektor

WO 00/345

zur Herstellung eines transgenen C. elegans verwendet werden. In einer anderen besonderen Ausführungsform wird das Transgen und/oder der Vektor zur Herstellung von transgenen Hefezellen, z. B. S. cerevisiae Zellen verwendet.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines nicht-humanen Organismus, z.B. eines transgenen C. elegans, wobei ein Transgen und/oder ein Vektor, der ein Transgen enthält, in die Gonaden des Organismus, also z.B. eines C. elegans mikroinjiziert wird. Gegenstand der Erfindung ist auch eine Zelle, die ein erfindungsgemäßes Transgen enthält und ein transgener C. elegans, der ein erfindungsgemäßes Transgen enthält. Die Erfindung betrifft auch eine Zelle, insbesondere eine Hefezelle, die ein erfindungsgemäßes Transgen vorzugsweise vorliegend in einem geeigneten Vektor enthält. Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Zellen, vorzugsweise Hefezellen, die das erfindungsgemäße Transgen und zusätzlich eine cDNA Bank enthalten.

15

20

25

30

Die Erfindung betrifft die Verwendung von transgenen bzw. rekombinanten Zellen, vorzugsweise Hefezellen oder eines transgenen C. elegans in einem Verfahren zur Bestimmung der γ -Sekretase bzw. der Aktivität der γ -Sekretase, die Verwendung dieser Zellen oder eines transgenen C. elegans in einem Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der Aktivität der γ -Sekretase sowie das Verfahren selbst.

Insbesondere betrifft die Erfindung Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer γ-Sekretase inhibieren, wobei das Verfahren die folgenden Verfahrensschritte enthält:

 Herstellung eines transgenen nicht-humanen Organismus, z.B. eines transgenen C. elegans oder Saccaromyces cerensiae oder einer transgenen Zelle, wobei der transgene nicht-humane Organismus oder die transgene Zelle ein Transgen enthält, das folgenden Bestandteile aufweist:



- a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
- b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert und
- c) einen Promotor und der transgene nicht-humane Organismus oder die transgenen Zelle außerdem ein Reporterplasmid enthält, wobei das Reporterplasmid eine Proteinbindungsstelle, einen Minimalpromotor und ein Reportergen trägt und gegebenenfalls eine cDNA, die eine γ -Sekretase kodiert, wobei der transgene nicht-humane Organismus oder die transgene Zelle das Transgen und gegebenenfalls die durch die cDNA kodierte γ -Sekretase exprimiert:
- der transgene nicht-humane Organismus oder die transgene Zelle mit einer
 zu untersuchenden Substanz inkubiert wird und
 - 3. die Menge an zweitem Teilprotein detektiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität der Y-Sekretase inhibieren, wobei

20

5

10

- 1. ein Transgen bereitgestellt wird, das die folgenden Bestandteile enthält:
- a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die

Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert.

25

- b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert und
- c) einen Promotor und
- d) gegebenenfalls weiter kodierende und/oder nicht-kodierende Nukleotidsequenzen;

30

2. dieses Transgen und ein Reporterplasmid und gegebenenfalls eine



cDNA, die für eine γ -Sekretase kodiert, in eine Zelle eingebracht werden und das durch das Transgen kodierte Fusionsprotein und gegebenenfalls die durch die cDNA kodierte γ -Sekretase in Gegenwart einer zu untersuchenden Substanz exprimiert werden;

- 3. das Fusionsprotein durch in der Zelle vorliegende _Y-Sekretase innerhalb der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1
- a) gespalten oder
- b) nicht gespalten wird, wodurch entweder
- 10
- a) ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, gebildet werden, oder
- b) keine nachweisbare Menge an ersten und/oder zweitem Teilproteingebildet wird;
 - 4. bestimmt wird, ob zweites Teilprotein gebildet wurde.
- Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Identifizierung von Substanzen,
 die die Aktivität einer γ-Sekretase inhibieren, wobei ein Transgen, das für ein Protein
 kodiert, das ein Signalpeptid und die SEQ ID NO. 1 enthält in Gegenwart einer zu
 untersuchenden Substanz und eines Reporterplasmids exprimiert wird und der
 Effekt der zu untersuchenden Substanz auf die Menge an gebildetem zweitem
 Teilprotein bestimmt wird, wobei das zweite Teilprotein die Aminosäuresequenz
 VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält.
 - Gegenstand der Erfindung sind auch Inhibitoren einer _Y-Sekretase, die durch die Verfahren identifiziert werden.
- 30 Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei ein mit Hilfe der vorstehend beschriebenen Verfahren identifizierter

14

pharmazeutischer Wirkstoff (z.B. Inhibitor) durch Formulierung und/oder Mischung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger weiterverarbeitet wird.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Test-Kit zur Durchführung der vorstehend genannten Verfahren.

Unter anderem können die Verfahren z.B. in Verbindung mit dem C100-Gal 4-VP16 System (d.h. einem Fusionsprotein bestehend aus C100, Gal4 und VP16 bzw. unter Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein entsprechendes Fusionsprotein kodiert) angewendet werden für:

- 1. Identifizierung und Bestimmung (qualitativ und/oder quantitativ) der Aktivität einer γ -Sekretase.
- Identifizierung von γ-Sekretasen in unterschiedlichen Geweben, Zellen und Organismen bzw. Spezies. Identifizierung und Isolierung der betreffenden cDNA's, die für diese γ-Sekretase kodieren und die weitere Verwendung der cDNA's.
- Screening in vivo, z.B. in Hefe-Zellen (Saccharomyces Cereviriae) oder C.
 elegans, wobei die Aktivität der γ-Sekretase ohne Verwendung immunbiologischer Methoden bestimmt werden kann.
- Anwendung des Verfahrens zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, z.B. pharmakologischen Wirkstoffen, die die Aktivität der γ-Sekretase
 modulieren, z.B. Inhibitoren der γ-Sekretase. Insbesondere kann dieses Verfahren in einem HTS (Hochdurchsatz Screening) eingesetzt werden. Beispielsweise können Substanzen identifiziert werden, die zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit und/ oder zur vorbeugenden Behandlung eingesetzt werden können.
- 30 5. Untersuchungen im Rahmen der Alzheimer'schen Krankheit, z.B. mit mutagenisiertem APP bzw. C100.



- 6. Die beschriebenen Fusionsproteine/Transgene, z.B. C100 in SP-C100-Gal 4-VP16 können durch Gesamt-APP ersetzt werden und mit Hilfe der Verfahren ebenfalls die γ -Sekretase, ihre Aktivität und Regulation untersucht werden.
- 5 Figur 1: Figur 1 zeigt das Amyloid Vorläuferprotein (Isoform APP695 und Isoformen APP770 bzw. APP751) und Sekretase Spaltprodukte.
- Figur 2: Zeigt schematisch das den Verfahren zugrunde liegende Prinzip:
 ß-Sekretase Spaltstelle am N-Terminus; γ-Sekretase Spaltstelle in der
 Transmembrandomäne; C100 = C100 Fragment von APP; Gal4-VP16 = DNA bindende Domäne, transkriptionsaktivierende Domäne (bestehend aus DNA-bindender Domäne und Transkriptionsaktivator), die an die proteinbindende Domäne auf der DNA des Reporterplasmids bindet.
- Figur 3: Konstruktion des Expressionsplasmids SP-C100-Gal4-VP16:

 aa= Aminosäuren; Restriktionsschnittstellen Sac I, Hind III und Kpn I unter Angabe der Position der Schnittstelle auf dem Plasmid.
 - Figur 4: Expressionsplasmid pDBTRP-MET25-SP-C100-Gal4-VP16:
- 20 Konstruktion des Expressionsplasmids für die Expression des Transgens in Hefe.

Beispiele:

Beispiel 1: Konstruktion des Expressionsplasmids SP-C100-Gal4-VP16

- Das Plasmid kodiert das APP-Signalpeptid (SP), das an die C-terminalen 100 Aminosäurereste von APP (C100) fusioniert ist. C100 beginnt mit dem N-Terminus des Aß-Peptids und endet mit dem C-Terminus von APP. Es muß noch durch die γ -Sekretase geschnitten werden, um das Aß-Peptid freizusetzen.
- An den C-Terminus von SP-C100 wurde Gal4-VP16 fusioniert. Gal4-VP16 setzt sich aus den ersten 147 Aminosäureresten des Hefe-Transkriptionsaktivators Gal4 und den 78 C-terminalen Aminosäureresten von VP16, eines Transkriptionsaktivators



aus dem Herpes Simplex Virus zusammen. Als Fusionsprotein übernimmt das Gal 4

-Fragment die Funktion der DNA-Bindung während das VP16-Fragment die

Transkription aktiviert (Sadowski et al., (1988) Science 335, 563). Als Vektorplasmid diente pcDNA3.1+ von der Firma Invitrogen, Niederlande.

5

Beispiel 2: Konstruktion des Reporterplasmids pGL2 MRG5 EGFP

Das Reporterplasmid pGL2 MRG5 hat fünf Gal 4-Bindungsstellen vor der HIV-TATA
Box. Zur leichteren Detektion in Zellkultur wurde das Luciferasegen gegen das Gen für EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) aus dem Vektor pEGFP N1 von der Firma Clontech, Heidelberg ausgetauscht.

Beispiel 3:

- Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-Zellen) wurden mit beiden Plasmiden cotransfiziert und anschließend unter Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 480 nm, wodurch EGFP angeregt wird, mikroskopisch analysiert. Es konnten zum Teil sehr stark grün leuchtende Zellen detektiert werden.
- Da dieser Effekt ebenfalls auf einer Expression des EGFP durch das
 Reporterplasmid ohne spezifische Aktivierung beruhen könnte, wurden SH-SY5Y
 Zellen nur mit Reporterplasmid transfiziert. Bei diesen Zellen war keine
 Grünfluoreszenz detektierbar. Die Expression muß daher durch Gal4-VP16 aktiviert
 werden, was eine proteolytische Freisetzung des APP-C-Terminus voraussetzt.
- 25 Bislang sind abgesehen von der γ-Sekretase keine weiteren proteolytischen Aktivitäten beschrieben worden, die APP innerhalb der Transmembrandomäne oder im cytoplasmatischen Teil proteolytisch prozessieren. Daher wird angenommen, daß der Freisetzung des APP-C-Terminus, fusioniert an Gal 4-VP16, die Aktivität der γ-Sekretase zugrunde liegt.



Beispiel 4:

Verwendung des C100-Gal4-VP16 Systems zur Detektion einer cDNA kodierend für eine γ-Sekretaseaktivität in cDNA-Banken:

5

10

SPC100-Gal4-VP16 wurde in den Hefe-Expressionsvektor pDBTRP (Life Technologies Rockville, MD, U.S.A.) unter Kontrolle des MET25-Promotors kloniert und der Hefestamm MaV203 (Life Technologies) mit diesen Konstrukten transformiert. Der Hefestamm MaV203 ist genetisch modifiziert und enthält drei GAL4 induzierbare Reporter Gene (URA3, HIS3, LacZ), die stabil in das Genom integriert sind. Die Expression der SPC100-Gal4-VP16 cDNA in MaV203 ergab eine nur geringe Aktivität der Reporter, so daß dieses System für eine Suche nach einer γ-Sekretase in einer cDNA Bank geeignet ist.

15 Beispiel 5:

Die rekombinanten MaV203 Zellen aus Beispiel 4 können beispielsweise für die Identifizierung von γ-Sekretasen bzw. das Screenen einer humanen B-Zell cDNA Bank (American Type Culture Collection, Manassas, VA, U.S.A.) verwendet werden.

20 Analog könnte auch eine humane hippocampale cDNA Bank, integriert in die Hefe-Expressionsvektoren p415-MET25 (ATCC, Nucleic Acid Research, 1994, Vol. 22, No. 25, 5767) oder p415-ADH1 (ATCC, GENE, 1995, 158: 119-122) für ein Screening nach einer cDNA, die für eine γ-Sekretase oder ein Protein mit γ-Sekretaseaktivität kodiert, eingesetzt werden.

(SEQ ID NO.: 1)

GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML

5

Erstes Teilprotein (SEQ ID NO.: 2)

GAIIGLMVGGVV

10

Zweites Teilprotein (SEQ ID NO.: 3)

VIVITLVML

15

Aminosäuresequenz eines C100 -Fragments (SEQ ID NO.: 4)

LDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIATVIVITL

20 VMLKKKQYTS IHHGVVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN

Aminosäuresequenz eines Signalpeptids von APP (SEQ ID NO.: 5)

25 MLPGLALFLL AAWTARA

Aminosäuresequenz eines SP-C100 Fragments (SEQ ID NO.: 6)

30 MLPGLALFLL AAWTARALDA EFRHDSGYEV HHQKLVFFAE DVGSNKGAII
GLMVGGVVIA TVIVITLVML KKKQYTSIHH GVVEVDAAVT PEERHLSKMQ
QNGYENPTYK FFEQMQN



Transkriptionsaktivierende Domäne VP16 mit GAL4 Bindungsdomäne (GAL4-VP16) (SEQ ID NO.: 7)

- 5 MKLLSSIEQA CDICRLKKLK CSKEKPKCAK CLKNNWECRY SPKTKRSPLT
 RAHLTEVESR LERLEQLFLL IFPREDLDMI LKMDSLQDIK ALLTGLFVQD
 NVNKDAVTDR LASVETDMPL TLRQHRISAT SSSEESSNKG QRQLTVSPEF
 10 PGIWAPPTDV SLGDELHLDG EDVAMAHADA LDDFDLDMLG DGDSPGPGFT
 PHDSAPYGAL DMADFEFEQM FTDALGIDEY GG
- Nukleotidsequenz eines Transgens kodierend für SP-C100-Gal4-VP16 (SEQ ID NO.: 8)
- GGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTAC ${\tt GGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC}$ 20 ${\tt CCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT}$ GGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG 25 ${\tt GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGA}$ AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCACAGCTAGCGCA $\tt CTGGATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCAAAAATTGGTGTTCTTTGCAGAAGATGTG$ 30 ${\tt GGTTCAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGACAGTGATCGTCATCACCTTG}$ GTGATGCTGAAGAAAACAGTACACATCCATTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGTCACCCCAGAG GAGCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGCAGAAC GCGCGGGGTACCCCGGCG ATGAAGC TACTGTCTTC TATCGAACAA GCATGCGATA TTTGCCGACT TAAAAAGCTC AAGTGCTCCA AAGAAAAACC GAAGTGCGCC AAGTGTCTGA AGAACAACTG GGAGTGTCGC TACTCTCCCA AAACCAAAAG GTCTCCGCTG ACTAGGGCAC ATCTGACAGA AGTGGAATCA AGGCTAGAAA GACTGGAACA GCTATTTCTA CTGATTTTTC CTCGAGAAGA CCTTGACATG ATTTTGAAAA TGGATTCTTT ACAGGATATA AAAGCATTGT TAACAGGATT ATTTGTACAA GATAATGTGA ATAAAGATGC CGTCACAGAT AGATTGGCTT CAGTGGAGAC TGATATGCCT CTAACATTGA GACAGCATAG AATAAGTGCG ACATCATCAT CGGAAGAGAG 40 TAGTAACAAA GGTCAAAGAC AGTTGACTGT ATCG CCGGAATTCCCGGGGATCTGGGC CCCCCCGAC CGATGTCAGC CTGGGGGACG AGCTCCACTT AGACGGCGAG GACGTGGCGA TGGCGCATGC CGACGCGCTA GACGATTTCG ATCTGGACAT GTTGGGGGAC GGGGATTCCC CGGGGCCGGG ATTTACCCCC CACGACTCCG CCCCTACGG CGCTCTGGAT ATGGCCGACT TCGAGTTTGA GCAGATGTTT ACCGATGCCC TTGGAATTGA CGAGTACGGT GGGTAG

Nukleotidsequenz von dem Säugetier-Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Firma Invitrogen, Niederlande) (SEQ ID NO.: 9)

WO 00/345

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA GCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAA GGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTAC GGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC 5 ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT GGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG 10 ${\tt GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTA}$ ${\tt ATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAC}$ ${\tt TAGTCCAGTGTGGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAA}$ 15 ${\tt TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT}$ ${\tt CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGGGGAAAGAACCAGCTGGGGGCTCTAGGGGGTATCCC}$ CACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGCGGGGTGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC 20 AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAA GCTCTAAATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGAT TAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG TTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTA TAAGGGATTTTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAA 25 ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGT GAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGT 30 ATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCAC ${\tt GCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCT}$ $\tt CTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGGCTATCGTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTG$ 35 TCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCG GTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCG CGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT GGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCT 40 ACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCT ${\tt CCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAA}$ TGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGG GCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG CCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATA 45 **AAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAC** CGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA CATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG GCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT 50 CGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGG CGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGT 55 ATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCT GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG GCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA



GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCAC GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTT TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA TCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAG TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA 10 TGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGAT GCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT GCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTT CTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA ${\tt AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTT}$ ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGC GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

20

Nukleotidsequenz von APP (SEQ ID NO.:10)

AGTTTCCTCG GCAGCGGTAG GCGAGAGCAC GCGGAGGAGC GTGCGCGGGG GCCCCGGGAG ACGGCGGCGG TGGCGGCGC GGCAGAGCAA GGACGCGGCG GATCCCACTC GCACAGCAGC 25 GCACTCGGTG CCCCGCGCAG GGTCGCGATG CTGCCCGGTT TGGCACTGCT CCTGCTGGCC GCCTGGACGG CTCGGGCGCT GGAGGTACCC ACTGATGGTA ATGCTGGCCT GCTGGCTGAA CCCCAGATTG CCATGTTCTG TGGCAGACTG AACATGCACA TGAATGTCCA GAATGGGAAG TGGGATTCAG ATCCATCAGG GACCAAAACC TGCATTGATA CCAAGGAAGG CATCCTGCAG TATTGCCAAG AAGTCTACCC TGAACTGCAG ATCACCAATG TGGTAGAAGC CAACCAACCA 30 GTGACCATCC AGAACTGGTG CAAGCGGGGC CGCAAGCAGT GCAAGACCCA TCCCCACTTT GTGATTCCCT ACCGCTGCTT AGTTGGTGAG TTTGTAAGTG ATGCCCTTCT CGTTCCTGAC AAGTGCAAAT TCTTACACCA GGAGAGGATG GATGTTTGCG AAACTCATCT TCACTGGCAC ACCGTCGCCA AAGAGACATG CAGTGAGAAG AGTACCAACT TGCATGACTA CGGCATGTTG CTGCCCTGCG GAATTGACAA GTTCCGAGGG GTAGAGTTTG TGTGTTGCCC ACTGGCTGAA GAAAGTGACA ATGTGGATTC TGCTGATGCG GAGGAGGATG ACTCGGATGT CTGGTGGGGC GGAGCAGACA CAGACTATGC AGATGGGAGT GAAGACAAAG TAGTAGAAGT AGCAGAGGAG GAAGAAGTGG CTGAGGTGGA AGAAGAAGAA GCCGATGATG ACGAGGACGA TGAGGATGGT GATGAGGTAG AGGAAGAGC TGAGGAACCC TACGAAGAAG CCACAGAGAG AACCACCAGC ATTGCCACCA CCACCACCAC CACCACAGAG TCTGTGGAAG AGGTGGTTCG AGTTCCTACA 40 ACAGCAGCCA GTACCCCTGA TGCCGTTGAC AAGTATCTCG AGACACCTGG GGATGAGAAT GAACATGCCC ATTTCCAGAA AGCCAAAGAG AGGCTTGAGG CCAAGCACCG AGAGAGAATG TCCCAGGTCA TGAGAGAATG GGAAGAGGCA GAACGTCAAG CAAAGAACTT GCCTAAAGCT GATAAGAAGG CAGTTATCCA GCATTTCCAG GAGAAAGTGG AATCTTTGGA ACAGGAAGCA GCCAACGAGA GACAGCAGCT GGTGGAGACA CACATGGCCA GAGTGGAAGC CATGCTCAAT 45 GACCGCCGCC GCCTGGCCCT GGAGAACTAC ATCACCGCTC TGCAGGCTGT TCCTCCTCGG CACACCCTAA AGCATTTCGA GCATGTGCGC ATGGTGGATC CCAAGAAAGC CGCTCAGATC CGGTCCCAGG TTATGACACA CCTCCGTGTG ATTTATGAGC GCATGAATCA GTCTCTCTCC CTGCTCTACA ACGTGCCTGC AGTGGCCGAG GAGATTCAGG ATGAAGTTGA TGAGCTGCTT 50 CAGAAAGAGC AAAACTATTC AGATGACGTC TTGGCCAACA TGATTAGTGA ACCAAGGATC AGTTACGGAA ACGATGCTCT CATGCCATCT TTGACCGAAA CGAAAACCAC CGTGGAGCTC CTTCCCGTGA ATGGAGAGTT CAGCCTGGAC GATCTCCAGC CGTGGCATTC TTTTGGGGCT GACTCTGTGC CAGCCAACAC AGAAAACGAA GTTGAGCCTG TTGATGCCCG CCCTGCTGCC GACCGAGGAC TGACCACTCG ACCAGGTTCT GGGTTGACAA ATATCAAGAC GGAGGAGATC TCTGAAGTGA AGATGGATGC AGAATTCCGA CATGACTCAG GATATGAAGT TCATCATCAA 55 AAATTGGTGT TCTTTGCAGA AGATGTGGGT TCAAACAAAG GTGCAATCAT TGGACTCATG

GTGGGCGGTG	TTGTCATAGC	GACAGTGATC	GTCATCACCT	TGGTGATGCT	GAAGAAGAAA
CAGTACACAT	CCATTCATCA	TGGTGTGGTG	GAGGTTGACG	CCGCTGTCAC	CCCAGAGGAG
CGCCACCTGT	CCAAGATGCA	GCAGAACGGC	TACGAAAATC	CAACCTACAA	GTTCTTTGAG
CAGATGCAGA	ACTAGACCCC	CGCCACAGCA	GCCTCTGAAG	TTGGACAGCA	AAACCATTGC
TTCACTACCC	ATCGGTGTCC	ATTTATAGAA	TAATGTGGGA	AGAAACAAAC	CCGTTTTATG
ATTTACTCAT	TATCGCCTTT	TGACAGCTGT	GCTGTAACAC	AAGTAGATGC	CTGAACTTGA
ATTAATCCAC	ACATCAGTAA	TGTATTCTAT	CTCTCTTTAC	ATTTTGGTCT	CTATACTACA
TTATTAATGG	GTTTTGTGTA	CTGTAAAGAA	TTTAGCTGTA	TCAAACTAGT	GCATGAATAG
ATTCTCTCCT	GATTATTTAT	CACATAGCCC	CTTAGCCAGT	TGTATATTAT	TCTTGTGGTT
TGTGACCCAA	TTAAGTCCTA	CTTTACATAT	GCTTTAAGAA	TCGATGGGGG	ATGCTTCATG
TGAACGTGGG	AGTTCAGCTG	CTTCTCTTGC	CTAAGTATTC	CTTTCCTGAT	CACTATGCAT
TTTAAAGTTA	AACATTTTTA	AGTATTTCAG	ATGCTTTAGA	GAGATTTTTT	TTCCATGACT
GCATTTTACT	GTACAGATTG	CTGCTTCTGC	TATATTTGTG	ATATAGGAAT	TAAGAGGATA
CACACGTTTG	TTTCTTCGTG	CCTGTTTTAT	GTGCACACAT	TAGGCATTGA	GACTTCAAGC
TTTTCTTTTT	TTGTCCACGT	ATCTTTGGGT	CTTTGATAAA	GAAAAGAATC	CCTGTTCATT
GTAAGCACTT	TTACGGGGCG	GGTGGGGAGG	GGTGCTCTGC	TGGTCTTCAA	TTACCAAGAA
TTCTCCAAAA	CAATTTTCTG	CAGGATGATT	GTACAGAATC	ATTGCTTATG	ACATGATCGC
TTTCTACACT	GTATTACATA	AATAAATTAA	ATAAAATAAC	CCCGGGCAAG	ACTTTTCTTT
GAAGGATGAC	TACAGACATT	AAATAATCGA	AGTAATTTTG	GGTGGGGAGA	AGAGGCAGAT
TCAATTTTCT	TTAACCAGTC	TGAAGTTTCA	TTTATGATAC	AAAAGAAGAT	GAAAATGGAA
GTGGCAATAT	AAGGGGATGA	GGAAGGCATG	CCTGGACAAA	CCCTTCTTTT	AAGATGTGTC
TTCAATTTGT	ATAAAATGGT	GTTTTCATGT	AAATAAATAC	ATTCTTGGAG	GAGC
	CAGTACACAT CGCCACCTGT CAGATGCAGA TTCACTACCC ATTTACTCAT ATTAATCCAC TTATTAATGG ATTCTCTCT TGTGACCCAA TGAACGTGGG TTTAAAGTTA GCATTTTACT CACACGTTTG TTTTCTTTT GTAAGCACT TTTCTCTTTT GTAAGCACT TTTCTCAAAA TTTCTCACACT GAAGGATGAC TCAATTTTCT GTGGCAATAT	CAGTACACAT CCATTCATCA CGCCACCTGT CCAAGATGCA CAGATGCAGA ACTAGACCCC TTCACTACCC ATCGGTGTCC ATTTACTCAT TATCGCCTTT ATTAATCCAC ACATCAGTAA TTATTAATGG GTTTTGTGTA ATTCTCTCT GATTATTTAT TGTGACCCAA TTAAGTCCTA TGAACGTGGG AGTTCAGCTG TTTAAAGTTA AACATTTTTA GCATTTTACT GTACAGATTG CACACGTTTG TTTCTTCGTG TTTTCTTTTT TTGTCCACGT GTAAGCACTT TTACGGGGCG TTCTCCAAAA CAATTTCTG TTTCTACACT GTATTACATA GAAGGATGAC TACAGACATT TCAATTTTCT TTAACCAGTC GTGGCAATAT AAGGGGATGA	CAGTACACAT CCATTCATCA TGGTGTGGTG CGCCACCTGT CCAAGATGCA GCAGAACGGC CAGATGCAGA ACTAGACCCC CGCCACAGCA TTCACTACCC ATCGGTGTCC ATTTATAGAA ATTTACTCAT TATCGCCTTT TGACAGCTGT ATTAATCCAC ACATCAGTAA TGTATTCTAT TTATTAATGG GTTTTGTGTA CTGTAAAGAA ATTCTCTCCT GATTATTTAT CACATAGCCC TGTGACCCAA TTAAGTCCTA CTTTACATAT TGAACGTGGG AGTTCAGCTG CTTCTCTTGC TTTAAAGTTA AACATTTTA AGTATTCAG GCATTTTACT GTACAGATTG CTGCTTCTGC CACACGTTTG TTTCTTCGTG CCTGTTTTAT TTTTCTTTTT TTGTCCACGT ATCTTTGGT GTAAGCACTT TTACGGGGCG GGTGGGGAGG TTCTCCAAAA CAATTTCTG CAGGATGATT TTTCTACACT GTATTACATA AATAAATTAA GAAGGATGAC TACAGACATT AAATAATCGA TCAATTTTCT TTAACCAGTC TGAAGTTTCA GTGGCAATAT AAGGGGATGA GGGGGAGG TCCAATTTTCT TTAACCAGTC TGAAGTTTCA	CAGTACACAT CCATTCATCA TGGTGTGGTG GAGGTTGACG CGCCACCTGT CCAAGATGCA GCAGAACGGC TACGAAAATC CAGATGCAGA ACTAGACCCC CGCCACAGCA GCCTCTGAAG TTCACTACCC ATCGGTGTCC ATTTATAGAA TAATGTGGGA ATTTACTCAT TATCGCCTTT TGACAGCTGT GCTGTAACAC ATTAATCCAC ACATCAGTAA TGTATTCTAT CTCTCTTTAC TTATTAATGG GTTTTGTGTA CTGTAAAGAA TTTAGCTGTA ATTCTCTCT GATTATTAT CACATAGCCC CTTAGCCAGT TGTGACCCAA TTAAGTCCTA CTTTACATAT GCTTTAAGAA TGAACGTGGG AGTTCAGCTG CTTCTCTTGC CTAAGTATTC TTTAAAGTTA AACATTTTTA AGTATTCAG ATGCTTTAGA GCATTTTACT GTACAGATTG CTGCTTCTGC TATATTTGTG CACACGTTTG TTTCTTCGTG CCTGTTTTAT GTGCACACAT TTTTCTTTTT TTGTCCACGT ATCTTTGGGT CTTTTGATAAA GTAAGCACTT TTACGGGGCG GGTGGGGAGG GGTGCTCTGC TTCTCCAAAA CAATTTCTG CAGGATGATT GTACAGAATC TTTCTACACT GTATTACATA AATAAATTAA ATAAAATAAC GAAGGATGAC TACAGACATT AAATAATCGA AGTAATTTTG TCAATTTTCT TTAACCAGTC TGAAGTTTCA TTTATGGATAC GTGGCAATAT AAGGGGATGA GCCTGGACAAA	CAGTACACAT CCATTCATCA TGGTGGTG GAGGTTGACG CCGCCACCTGT CCAAGATGCA GCAGAACGGC TACGAAAATC CAACCTACAA CAGATGCAGA ACTAGACCCC CGCCACAGCA GCCTCTGAAG TTGGACAGCA ATTAATCACA ATTAATCACA ATTAATCCAC ACATCAGTAA ACATCAGTAA ACATCAGTAA ATTATCTCAT TATCGCCTTT TGACAGCTGT CTCTCTTTAC ATTTTGTCT TTATTAATGG TTTAATTAT TGTGACCCAA ATTAATCAC ATTAATTAT TGTGACCCAA ACTAGTCAT TATCTCTCT GATTATTATT TGTGACCCAA TTAAGTCCT TTAAGTCT TTAAGTCCT TTAAGTCCT TTTACAGCC TTATTTTC TGTCCAGCT TTTCTTTGT TTTCTTCT TTTCTTCGT TTTCTTCGT TTTCTTCGT TTTCTTCTT TTGTCCACGT TTTCTTGGGT TTTTCTTCT TTGCCACGT TTACGGGGGG GGTGGGGAGG GGTGCTCTGC TGGTCTTCAA TTTCTCAAA CAATTTTCT CAGGGGGG GGTGGGGAGG GGTGCTCTGC TGGTCTTCAA TTTCTCAAAA CAATTTTCT TTACAGACATT TAAGACATT TTACAGACAT TTACAGACAT TAAAAATTAA ATAAAATTAA ATAAAATTAC CCCGGGCAAG GGTGGGAAAAT CCACTTACAA CACTTCTC TTAACCAGT TTTCTTCTT TTACCAGACAT TAAGCACT TTACAGACAT TTACAGACAT TTAACAGACAT TAAAAATTAA ATAAAATTAC CCCGGGCAAG TCAATTTTCT TTAACCAGT TGAAGGCATG CCCTTCTTTT TTAACAGACAT TTAACAGACAT TTAAGGACAAA CCCTTCTTTT

25 Nukleotidsequenz des Plasmids pDBTRP (SEQ ID NO. 11):

 ${\tt GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGGACGGATCGC}$ 30 TGAAACAATTCGGCATTAATACCTGAGAGCAGGAAGAGCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAG TATTTATATTAAAAATTTAAATTATTATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGG GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA ${\tt CCCTGATAAATGCTTCAATAATCTGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAA}$ AAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCA ACGGGAAACGTCTTGCTGGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCG ${\tt CGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTTTCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAA}$ 40 ACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCC TCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCGCGGGAAAAC AGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCG GTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACG 45 AGAAATGCATACGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTAT $\tt TTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGC$ ${\tt CATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAA}$ TCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTA ACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCAC 50 TGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG ${\tt CAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA}$ ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAAC TCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT 55 CAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTT



GGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGC TCGTCAGGGGGGCCGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCT 5 CCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGT ${\tt GAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCT}$ ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGA ATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGATCCCGAGCTTTGCAAATTAAAGCCTTCGAGCGTCCCAA 10 $\tt GACAAAGGAAAAGGGGCCTGTTTACTCACAGGCTTTTTTCAAGTAGGTAATTAAGTCGTTTCTGTCTTTTTCCTT$ 15 GAATTAGATTAAACTGAAGATATATAATTTATTGGAAAATACATAGAGCTTTTTGTTGATGCGCTTAAGCGATCA ATTCAACAACACCACCAGCAGCTCTGATTTTTCTTCAGCCAACTTGGAGACGAATCTAGCTTTGACGATAACTG GAACATTTGGAATTCTACCCTTACCCAAGATCTTACCGTAACCGGCTGCCAAAGTGTCAATAACTGGAGCAGTTT CCTTAGAAGCAGATTTCAAGTATTGGTCTCTCTTGTCTTCTGGGATCAATGTCCACAATTTGTCCAAGTTCAAGA 20 CTGGCTTCCAGAAATGAGCTTGTTGCTTGTGGAAGTATCTCATACCAACCTTACCGAAATAACCTGGATGGTATT TATCCATGTTAATTCTGTGGTGATGTTGACCACCGGCCATACCTCTACCACCGGGGTGCTTTCTGTGCTTACCGA TACGACCTTTACCGGCTGAGACGTGACCTCTGTGCTTTCTAGTCTTAGTGAATCTGGAAGGCATTCTTGATTAGT TGGATGATTGTTCTGGGATTTAATGCAAAAATCACTTAAGAAGGAAAATCAACGGAGAAAGCAAACGCCATCTTA AATATACGGGATACAGATGAAAGGGTTTGAACCTATCTGGAAAATAGCATTAAACAAGCGAAAAACTGCGAGGAA 25 AATTGTTTGCGTCTCTGCGGGCTATTCACGCGCCAGAGGAAAATAGGAAAAATAACAGGGCATTAGAAAAATAAT TTCGATGAATCTCCAAAATGGTTGTTAGCACATGGAAGAGTCACCGATGCTAAGTTATCTCTATGTAAGCTACGT GGCGTGACTTTTGATGAAGCCGCACAAGAGATACAGGATTGGCAACTGCAAATAGAATCTGGGGATCCCCCCTCG AGATCCGGGATCGAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGGAAATCAAGGAGCATGAAGGCAAAAGACAAATATAAGG 30 $\tt GTCGAACGAAAAATAAAGTGAAAAGTGTTGATATGATGTTTTTGGCTTTGCGGCGCCGAAAAAACGAGTTTACGC$ TGCCCGGCGGAGTTTTTTGCGCCTGCATTTTCCAAGGTTTACCCTGCGCTAAGGGGCGAGATTGGAGAAGCAATA AGAATGCCGGTTGGGGTTGCGATGATGACGACCACGACAACTGGTGTCATTATTTAAGTTGCCGAAAGAACCTGA GTGCATTTGCAACATGAGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGACTTGCGAGACGCGAGTTTGCCGGTGGTGCGAACA TGCTACCAGTATAAATAGACAGGTACATACAACACTGGAAATGGTTGTCTGTTTGAGTACGCTTTCAATTCATTT GATATCCTTTTGTTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCCTCTTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATT 40 ${\tt CCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAGACA}$ AGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATTGATGGTGGTACATAACGAACTAATACTGT AGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATA CAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAATTAACGACAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGA 45 CGGTATACGGCCTTCCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATAAAAAAGTTTGCCGCTTTGCTATCAAGTATAAATA GACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTTCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTTTCTTCCTTGTTTCTTTTTCTGCACA TCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAAACCGAAGTGCGCCAAG 50 TGTCTGAAGAACAACTGGGAGTGTCGCTACTCTCCCAAAACCAAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACA GAAGTGGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCCTCGAGAAGACCTTGACATGATT TTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGAT GCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCGACA TCATCATCGGAAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGTCGAGGTCGACCCCGGGTGCTAGC 55 $\tt CCGCCACCGCGGTGGAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTC$ TACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATA WO 00/345

30

TGACTCTTAGGTTTTAAAACGAAAATTCTTGTTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGT ATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAATCGCTCCCCATTT ${\tt CACCCAATTGTAGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAATCTCGGTGTGTATTTTATGTCCTCAGAGGACA}$ ATACCTGTTGTAATCGTTCTTCCACACGGATCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGT CGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGC 5 CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAC GCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC $\tt CTAGCGCCGGCTTTCTTCTTTCCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT$ $\tt CGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGT$ 10 TCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGA CTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACA TAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTTAGAGTCTTTTA 15 CACCATTTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCACCAACATTTT CTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAATGTAAGCTTTCGGGGGCTCTCTTGCCTTCCAACCCAGTCAGAAATCG AGTTCCAATCCAAAAGTTCACCTGTCCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGAATGAGGTTTCTGTG ${\tt AAGCTGCACTGAGTATGTTGCAGTCTTTTGGAAATACGAGTCTTTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACTCTT}$ GGTATTCTTGCCACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGACCAGAGCCAAAACAT 20 CCTCCTTAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTTCGGAGTGCCTGAACTATTTTTATATGCTTTTACAA GACTTGAAATTTTCCTTGCAATAACCGGGTCAATTGTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACCCAGCAAGT TACCTGTGAAATTAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTTAATCACGTATACTCACGTGCTCAATA 25 ${\tt AAAGCTCCGGATCAAGATTGTACGTAAGGTGACAAGCTATTTTTCAATAAAGAATATCTTCCACTACTGCCATCT}$ $\tt CCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCT$ GCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGA

Nukleotidsequenz des rekombinanten Plasmids pDBTRP-MET25-SPC100-GAL4-VP16 (SEQ ID NO. 12):

35 ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGGACGGATCGCT ${\tt GAAACAATTCGGCATTAATACCTGAGAGCAGGAAGAGCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGA}$ ATTTATATAAAAAATTTAAATTATTATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGG GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC CCTGATAAATGCTTCAATAATCTGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAA 45 AATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAA CGGGAAACGTCTTGCTGGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGC GATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTTTCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAA CATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCT CTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCGCGGGAAAACA 50 GCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGG ${\tt TTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGA}$ GAAATGCATACGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATT TTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCC



ATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAAT CCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAA CACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACT GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC AAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTC 10 CCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGGGGCGCACGAGGGAGCTTCCAG GGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT $\tt CGTCAGGGGGGCCGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTT$ CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGGAAGAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAC 15 CGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTG AGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTA TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGAA TTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGATCCCGAGCTTTGCAAATTAAAGCCTTCGAGCGTCCCAAA 20 ${\tt ACAAAGGAAAAGGGGCCTGTTTACTCACAGGCTTTTTTCAAGTAGGTAATTAAGTCGTTTCTGTCTTTTTCCTTC}$ 25 AATTAGATTAAACTGAAGATATATATTTATTGGAAAATACATAGAGCTTTTTGTTGATGCGCTTAAGCGATCAA TTCAACAACACCACCAGCAGCTCTGATTTTTCTTCAGCCAACTTGGAGACGAATCTAGCTTTGACGATAACTGG ${\tt AACATTTGGAATTCTACCCTTACCCAAGATCTTACCGTAACCGGCTGCCAAAGTGTCAATAACTGGAGCAGTTTC}$ $\mathtt{CTTAGAAGCAGATTTCAAGTATTGGTCTCTTGTCTTCTGGGATCAATGTCCACAATTTGTCCAAGTTCAAGAC}$ TGGCTTCCAGAAATGAGCTTGTTGCTTGTGGAAGTATCTCATACCAACCTTACCGAAATAACCTGGATGGTATTT 30 ${\tt ATCCATGTTAATTCTGTGGTGATGTTGACCACCGGCCATACCTCTACCACCGGGGTGCTTTCTGTGCTTACCGAT}$ ACGACCTTTACCGGCTGAGACGTGACCTCTGTGCTTTCTAGTCTTAGTGAATCTGGAAGGCATTCTTGATTAGTT GGATGATTGTTCTGGGATTTAATGCAAAAATCACTTAAGAAGGAAAATCAACGGAGAAAGCAAACGCCATCTTAA ATATACGGGATACAGATGAAAGGGTTTGAACCTATCTGGAAAATAGCATTAAACAAGCGAAAAACTGCGAGGAAA ${\tt ATTGTTTGCGTCTCTGCGGGCTATTCACGCGCCAGAGGAAAATAGGAAAAATAACAGGGCATTAGAAAAATAATT}$ 35 TTGATTTTGGTAATGTGTGGGTCCTGGTGTACAGATGTTACATTGGTTACAGTACTCTTGTTTTTGCTGTGTTTT TCGATGAATCTCCAAAATGGTTGTTAGCACATGGAAGAGTCACCGATGCTAAGTTATCTCTATGTAAGCTACGTG GCGTGACTTTTGATGAAGCCGCACAAGAGATACAGGATTGGCAACTGCAAATAGAATCTGGGGATCCCCCCTCGA CGGATGCAAGGGTTCGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGCTTTTTCTCTTGAG.GTSGTCACATGATCGCAA AATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAACTGTGGTGGTTGGCAAATGACTAATTAAGTTAGTCAA 40 GGCGCCATCCTCATGAAAACTGTGTAACATAATAACCGAAGTGTCGAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACAC CTCTCTTGTCTTTTCATCTACTATTTCCTTCGTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATAGATACAATTCTATTACC $\tt CCCATCCATACATCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTCACAGCTAGCGCACT$ CGGTGCCCCGCGCAGGGTCGCGATGCTGCCCGGTTTGGCACTGTTCCTGCTGGCCGCCTGGACGGCTCGGGCGCT 45 GGATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCAAAAAATTGGTGTTCTTTGCAGAAGATGTGGG TTCAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGACAGTGATCGTCATCACCTTGGT GATGCTGAAGAAGAACAGTACACCCCATTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGTCACCCCAGAGGA GCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGCAGAACGC GCGGGGTACCCCGGCGATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAA 50 GTGCTCCAAAGAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACTGGGAGTGTCGCTACTCTCCCAAAACCAA AAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACT GATTTTTCCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAACAGG ${\tt AACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCGACATCATCATCGGAAGAGGTGAACAAGGTCAAAGACAGTTGAC}$ 55 CGAGGACGTGGCGATGCCGACGCGCTAGACGATTTCGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCC GGGGCCGGGATTTACCCCCCACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGAT GTTTACCGATGCCCTTGGAATTGACGAGTACGGTGGGTAGGGATCCACTAGTCCAGTGTGGAAATTCTGCAGA



 $\tt CGCTAAGTAAGACGTCGAGCTCTAAGTAAGTAACGGCCGCCGCGGTGGAGCTTTGGACTTCTTCGCCA$ GAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGG GTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTATTATTA AATAAGTTATAAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTAAAACGAAAATTCTTGTTCT TGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTA $\tt CCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAATCGCTCCCCATTTCACCCAATTGTAGATATGCTAACTCCAGCAATGAG$ TTGATGAATCTCGGTGTGTATTTTATGTCCTCAGAGGACAATACCTGTTGTAATCGTTCTTCCACACGGATCCCA ATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG 10 TTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC TCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTT ACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT 15 TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTAT $\tt CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA$ AAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTG GCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTTAGAGTCTTTTACACCATTTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACA 20 ${\tt CCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCACCAACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAATGTAAG}$ CTTTCGGGGCTCTCTTGCCTTCCAACCCAGTCAGAAATCGAGTTCCAATCCAAAAGTTCACCTGTCCCACCTGCT TCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGAATGAGGTTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTATGTTGCAGTCTTTTGGA AATACGAGTCTTTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACTCTTGGTATTCTTGCCACGACTCATCTCCATGCAGTTGG 25 TATTTCGGAGTGCCTGAACTATTTTTATATGCTTTTACAAGACTTGAAATTTTCCTTGCAATAACCGGGTCAATT GTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACCCAGCAAGTCAGCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCCTCT GTGCTCTGCAAGCCGCAAACTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATAACAGACATACTCCAAGCT $\tt CTTTTTTCGACCGAATTAATTCTTAATCGGCAAAAAAAGAAAAGCTCCGGATCAAGATTGTACGTAAGGTGACAA$ GCTATTTTTCAATAAAGAATATCTTCCACTACTGCCATCTGGCGTCATAACTGCAAAGTACACATATATTACGAT GATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCCGCCAACACCCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCG GCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAA CGCGCGA

Aminosäuresequenz eines SP-C100-Gal4-VP16 Fusionsproteins (SEQ ID NO. 13):

MLPGLALFLL AAWTARALDA EFRHDSGYEV HHQKLVFFAE DVGSNKGAII

40 GLMVGGVVIA TVIVITLVML KKKQYTSIHH GVVEVDAAVT PEERHLSKMQ

QNGYENPTYK FFEQMQNARG TPAMKLLSSI EQACDICRLK KLKCSKEKPK

CAKCLKNNWE CRYSPKTKRS PLTRAHLTEV ESRLERLEQL FLLIFPREDL

DMILKMDSLQ DIKALLTGLF VQDNVNKDAV TDRLASVETD MPLTLRQHRI

SATSSSEESS NKGQRQLTVS PEFPGIWAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH

50 ADALDDFDLD MLGDGDSPGP GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALGI

DEY GG
Literatur:



- Estus et al. (1992), Science, 255, 726.
 Haass et al. (1992) Nature, 359, 322.
- Hilbich et al. (1991) J. Mol. Biol., 218, 149
- 5 Kang et al. (1987) Nature, 325, 733
 - Maruyama et al. (1994) Biochem. Biophys Res Commun, 202, 1517
 - Rumble et al. (1989), N. Engl. J. Med., 320, 1446
 - Sadowski et al.(1988) Nature, 335, 563
 - Scheuner et al. (1996), Nature Medicine, 2, 864
- 10 Simons et al. Neurosci (1996) 1;16(3):899-908
 - Suzuki et al. Science 1994 May 27;264(5163):1336-40
 - Yankner et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA,87, 9020



Patentansprüche:

5

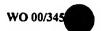
10

15

- 1. Verfahren zum Nachweis der Aktivität von y-Sekretase, wobei
 - ein Transgen verwendet wird, das ein Fusionsprotein kodiert und folgende Bestandteile enthält:
 - a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
 - b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert,
 - c) einen Promotor und
 - d) gegebenenfalls weitere kodierende und/oder nicht-kodierende Nukleotidsequenzen;
 - 2. dieses Transgen in eine Zelle eingebracht und das Fusionsprotein exprimiert wird;
 - 3. das Fusionsprotein durch in der Zelle vorliegende _Y-Sekretase innerhalb der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 gespalten wird, wodurch ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, gebildet werden und
 - 4. das erste Teilprotein und/oder das zweite Teilprotein detektiert werden.
- 2. Verfahren zum Nachweise der Aktivität von Y-Sekretase, wobei
- 25 1. ein Transgen verwendet wird, das ein Fusionsprotein kodiert und folgende Bestandteile enthält:
 - eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
- 30 b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert,
 - c) einen Promotor und

 d) gegebenenfalls weitere kodierende und/oder nicht-kodierende Nukleotidsequenzen;

- dieses Transgen in eine Zelle eingebracht und das Fusionsprotein exprimiert wird;
- das Fusionsprotein durch in der Zelle vorliegende γ-Sekretase innerhalb der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 gespalten wird, wodurch ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, gebildet werden und
 - 4. die Menge an zweitem Teilprotein bestimmt und aus der Menge an gebildetem zweitem Teilprotein die Aktivität der Y-Sekretase bestimmt wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, wobei die erste
 Nukleotidsequenz für ein Amyloid Vorläufer Protein (APP) oder einen Teil davon kodiert.
- Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei die erste
 Nukleotidsequenz für ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz SEQ
 ID NO. 4 hat.
 - 5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei die zweite Nukleotidsequenz für das Signalpeptid von APP (SP) kodiert.
 - 6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Signalpeptid die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 hat.
- Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei der
 Promotor ein Promotor für die Expression in Säugetierzellen, in C. elegans, in Hefe oder in Drosophila ist.



- 8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Promotor der CMV, HSV TK, RSV, SV40, LTR, unc119, unc54, hsp16-2, G₀A1, sel-12, ADH1, Gal1, MET3, MET25, MT, Ac5 oder Ds47 Promotor ist.
- 5 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Zelle eine eukaryotische Zelle ist.
 - Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zelle eine humane Zelle ist.

- 11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zelle eine nicht-humane Zelle ist.
- Verfahren nach Anpruch 11, wobei die Zelle eine HeLa, 293, H4, SH-SY5Y,
 H9, Cos, CHO, N2A, SL-2 oder Saccharomyces cerevisiae Zelle ist.
 - 13. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Zelle eine C. elegans Zelle ist.
- 14. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Zelle Bestandteil eines transgenen C.20 elegans ist.
 - 15. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Zelle eine Hefezelle ist.
- Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, wobei das
 Fusionsprotein die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 6 hat oder enthält.
 - 17. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16, wobei die weitere kodierende Nukleotidsequenz am 3'-Ende der ersten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.

30

18. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, wobei die weitere kodierende Nukleotidsequenz für ein Protein kodiert, das als



Fusionsprotein mit dem ersten Teilprotein und dem zweiten Teilprotein exprimiert wird und zur Detektion des zweiten Teilproteins verwendet werden kann.

- 5 19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 18, wobei die weitere kodierende Nukleotidsequenz für ein Protein kodiert, das eine DNA-bindende Domäne und eine transkriptionsaktivierende Domäne enthält.
- Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 19, wobei die
 weitere kodierende Nukleotidsequenz für ein Protein kodiert, das aus einer Gal4-bindenden Domäne und aus der transkriptionsaktivierenden Domäne von VP16 besteht (Gal4-VP16).
- Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 20, wobei die Zelle
 mit einem Reporterplasmid co-transfiziert wird, wobei das Reporterplasmid ein Reportergen unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors enthält.
 - 22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der regulierbare Promotor durch die transkriptionsaktivierende Domäne aktivierbar ist.
 - 23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Reporterplasmid das Reportergen für EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) kodiert und der regulierbare Promotor Gal4-Bindungsstellen und einen Minimalpromotor von HIV enthält.
- 25 24. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 23, wobei das Transgen die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 8 hat.
 - 25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 24, wobei das Transgen in einem Vektor vorliegt.



- 26. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 25, wobei der rekombinante Vektor die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 9 hat.
- Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 26, wobei in der
 Zelle keine endogene γ-Sekretase Aktivität nachweisbar ist.
 - 28. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 27, wobei die Zelle mit einer cDNA Bank co-transfiziert wird.
- 10 29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei in der cDNA Bank, cDNA hergestellt aus einem humanen oder nicht humanen Gewebe oder humanen oder nicht humanen Zellen, vorliegt.
- Verwendung eines Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche
 27 bis 29 zur Identifizierung einer cDNA, die für eine γ-Sekretase kodiert,
 wobei
 - a) eine Zelle identifiziert wird, in der die Aktivität einer γ-Sekretase nachweisbar ist und
 - b) aus dieser Zelle die cDNA, die für die γ-Sekretase kodiert, isoliert wird.

- 31. Transgen enthaltend
 - eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
- b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert,
 - c) einen Promotor und
 - d) mindestens eine weitere Nukleotidsequenz am 3'-Ende der ersten Nukleotidsequenz, die für eine DNA-bindende Domäne und für eine transkriptionsaktivierende Domäne kodiert.



- 32. Transgen nach Anspruch 31, wobei die erste Nukleotidsequenz für APP oder einen Teil von APP kodiert.
- Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 und 32, wobei das
 Transgen die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 8 hat.
 - 34. Vektor enthaltend ein Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 bis 33.
- Vektor nach Anspruch 34, wobei der Vektor die Nukleotidsequenz SEQ. ID
 NO. 9 oder SEQ ID NO. 12 hat.
 - 36. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Zelle, wobei eine Zelle mit einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 34 und 35 transfiziert wird.
 - 37. Verfahren zur Herstellung eines transgenen C. elegans, wobei ein Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 bis 33 in die Gonaden eines C. elegans mikroinjiziert wird.
- 20 38. Zelle enthaltend ein Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 bis 33.
 - 39. Transgener C. elegans enthaltend ein Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 bis 33.
 - 40. Hefezelle enthaltend ein Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 bis 33.
 - 41. Zelle enthaltend

- a) ein Transgen nach einem oder mehreren der Ansprüche 31 bis 33;
 - b) eine cDNA Bank, und
 - c) ein Reporterplasmid.



10

15

20

25

30

42. Verwendung einer Zelle nach Anspruch 41 zur Identifizierung einer cDNA, die für eine y-Sekretase kodiert. 43. Verfahren zur Identifizierung der cDNA einer γ-Sekretase, wobei 1) eine Zelle nach Anspruch 41 hergestellt und 2) bestimmt wird, ob zweites Teilprotein gebildet wird. 44. Verwendung einer Zelle nach Anspruch 41 in einem Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der Aktivität einer y-Sekretase. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer 45. Y-Sekretase inhibieren, wobei das Verfahren die folgenden Verfahrensschritte enthält: 1. Herstellung eines transgenen nicht-humanen Organismus oder einer transgenen Zelle, wobei der transgene nicht-humane Organismus oder die transgene Zelle ein Transgen enthält, das folgende Bestandteile hat: a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert, am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite b) Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert und c) einen Promotor und gegebenenfalls weitere nicht-kodierende und/oder kodierende d) Nukleotidsequenzen; und ein Reporterplasmid enthält, das eine Proteinbindungsstelle, einen Minimalpromotor und ein Reportergen trägt und gegebenenfalls eine cDNA, die eine y-Sekretase kodiert. wobei

der transgene nicht-humane Organismus oder die transgene Zelle das

Transgen und gegebenenfalls die durch die cDNA kodierte



y-Sekretase exprimiert;

- 2. der transgene nicht-humane Organismus oder die transgene Zelle mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird und
- 3. die Menge an zweitem Teilprotein bestimmt wird.

5

10

- 46. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer Y-Sekretase inhibieren, wobei
 - 1. ein Transgen verwendet wird, das folgende Bestandteile enthält:
 - a) eine erste Nukleotidsequenz, die für ein Protein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ ID NO. 1) enthält, kodiert,
 - b) am 5'-Ende der ersten Nukleotidsequenz eine zweite
 Nukleotidsequenz, die für ein Signalpeptid kodiert und
 - c) einen Promotor und

15

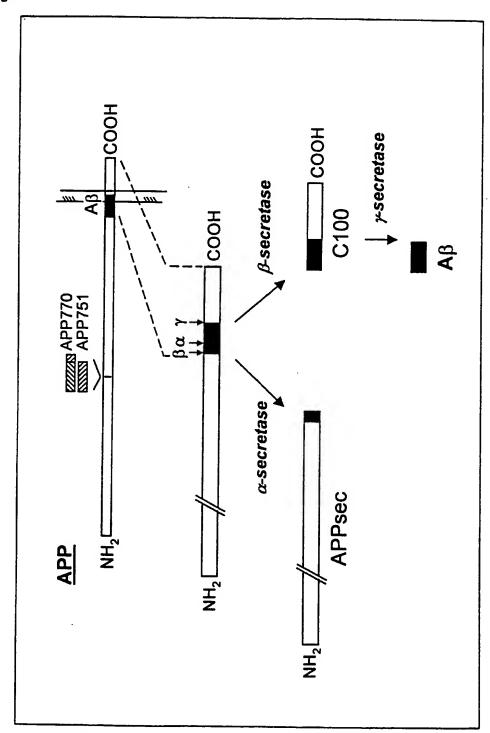
20

25

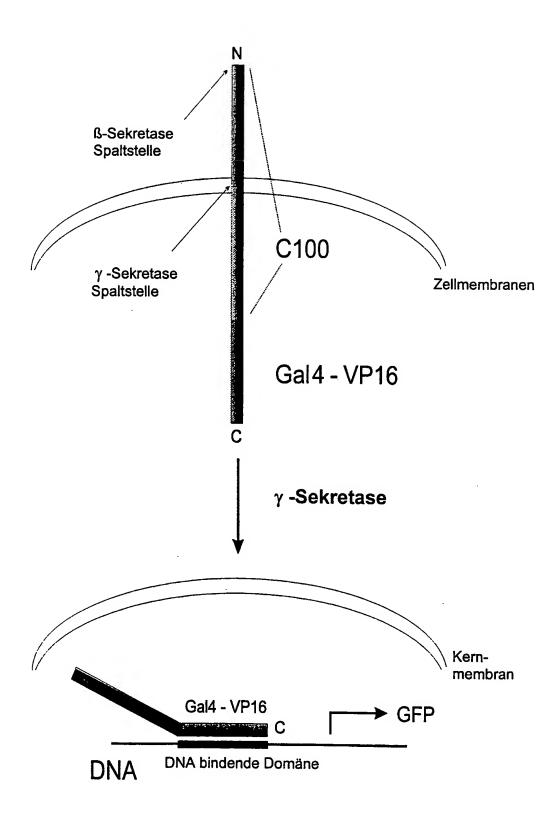
- d) gegebenenfalls weitere kodierende und/oder nicht-kodierende Nukleotidsequenzen;
- 2. dieses Transgen und ein Reporterplasmid und gegebenenfalls eine cDNA, die für eine γ -Sekretase kodiert, in eine Zelle eingebracht werden und das durch das Transgen kodierte Fusionsprotein und gegebenenfalls die durch die cDNA kodierte γ -Sekretase in Gegenwart einer zu untersuchenden Substanz exprimiert werden,
- 3. das Fusionsprotein durch in der Zelle vorliegende γ -Sekretase innerhalb der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 entweder
- a) gespalten wird wodurch ein erstes Teilprotein, das die Aminosäuresequenz GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO. 2) enthält und ein zweites Teilprotein, das die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält, gebildet werden, oder
 - b) nicht gespalten wird, wodurch keine nachweisbare Menge an erstem und/oder zweitem Teilprotein gebildet wird,
- die Menge an zweitem Teilprotein bestimmt wird.

- 36
- 47. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer Y-Sekretase inhibieren, wobei ein Transgen, das für ein Fusionsprotein, das ein Signalpeptid und die SEQ ID NO. 1 enthält, kodiert, in Gegenwart einer zu untersuchenden Substanz exprimiert wird und der Effekt der zu untersuchenden Substanz auf die Menge an gebildetem zweitem Teilprotein bestimmt wird, wobei das zweite Teilprotein die Aminosäuresequenz VIVITLVML (SEQ ID NO. 3) enthält.
- Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, umfassend ein Verfahren nach
 einem oder mehreren der Ansprüche 45 bis 47 und schließlich die Mischung
 des identifizierten Inhibitors mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.
- 49. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 45 bis 47, ferner umfassend die Formulierung des identifizierten Inhibitors in eine pharmazeutisch verträgliche Form.
 - 50. Test-Kit zum qualitativen und/oder zur quantitativen Nachweis einer _Y-Sekretase Aktivität, enthaltend ein Fusionsprotein, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 enthält.

Figure 1:



Figur 2:



Figur 3:

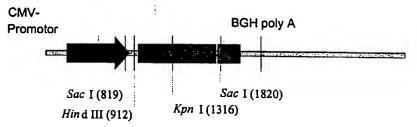
5

VP16 (C-terminale 78 aa)

Gal 4 (1-147 aa)

SP- C100

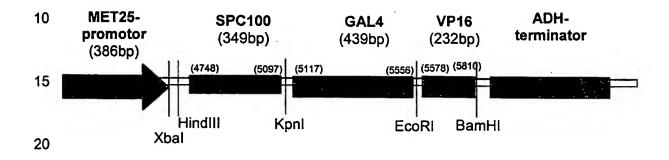
10



4/4

Figur 4:

5





WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZ International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51)	International Patent Classification: C12Q 1/68, C07K 14/47, C12N 5/10, C12N 15/10, C12N 15/12, C12N 15/81, C12N 15/83, G01N 33/68	А3	` '	tional Publication Number: tional Publication Date:	WO 00/34511 15 June 2000 (15.06.2000)
` ´	International Application Number:		EP99/09234	Published	
(22)	International Filing Date: 27 November	1999	(27.11.1999)		
(30)	Priority Data: 198 56 261.6 07 December1998 (0)	7.12.1	1998) DE		
(60)	Parent Application or Grant AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND G. (). PERAUS, Gisela [/]; ().	мвн	[/];		

(54) Title: A'beta'-PEPTIDE SCREENING ASSAY

(54) Titre: ANALYSE SELECTIVE DE A'beta'-PEPTIDE

(57) Abstract

The invention relates to a method for determining 'gamma'-secretase activity, to individual components of the method and the application of the method. The invention provides a novel method for determining 'gamma'-secretase activity and for detecting 'gamma'-secretase; particular embodiments of the method relate to methods for identifying a 'gamma'-secretase or a cDNA which codes for a 'gamma'-secretase and methods for identifying substances which can inhibit the activity of a 'gamma'-secretase. Substances of this type are particularly significant since they can be used, e.g. as pharmaceutical active agents, e.g. for treating Alzheimer's disease.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé permettant de déterminer l'activité de la 'gamma'-sécrétase, des constituants individuels du procédé et l'utilisation dudit procédé. L'invention vise à mettre au point un nouveau procédé pour déterminer l'activité de la 'gamma'-sécrétase et pour mettre en évidence la présence de la 'gamma'-sécrétase; des variantes particulières dudit procédé concernent d'une part des procédés visant à identifier une 'gamma'-sécrétase ou un ADNc, codant une 'gamma'-sécrétase et d'autre part des procédés visant à identifier des substances aptes à inhiber l'activité d'une 'gamma'-sécrétase. De telles substances prennent une importance certaine, du fait qu'elles peuvent s'utiliser par ex. comme principes actifs pharmaceutiques, par ex. pour traiter la maladie d'Alzheimer.



(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C12Q 1/68, C07K 14/47, C12N 15/12, 15/10, 5/10, 15/81, 15/83, G01N 33/68 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34511

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

15. Juni 2000 (15.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/09234

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. November 1999

(27.11.99)

А3

(30) Prioritätsdaten:

198 56 261.6

7. Dezember 1998 (07.12.98) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main

(72) Erfinder: PERAUS, Gisela; Agnes-Bernauer-Strasse 15, Veröffentlicht D-80687 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,

CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-16. November 2000 (16.11.00)

(54) Title: Aβ-PEPTIDE SCREENING ASSAY

(54) Bezeichnung: PEPTID SCREENING TEST ZUM NACHWEIS VON ASS

The invention relates to a method for determining γ -secretase activity, to individual components of the method and the application of the method. The invention provides a novel method for determining \gamma-secretase activity and for detecting \gamma-secretase; particular embodiments of the method relate to methods for identifying a γ -secretase or a cDNA which codes for a γ -secretase and methods for identifying substances which can inhibit the activity of a γ -secretase. Substances of this type are particularly significant since they can be used, e.g. as pharmaceutical active agents, e.g. for treating Alzheimer's disease.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität, einzelne Komponenten des Verfahrens und die Anwendung des Verfahrens. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neues Verfahren zur Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität und zum Nachweis von \(\gamma\)-Sekretase; besondere Ausführungsformen des Verfahrens betreffen einerseits Verfahren zur Identifizierung einer γ-Sekretase bzw. einer cDNA, die für eine γ-Sekretase kodiert und andererseits Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität einer γ -Sekretase inhibieren können. Solchen Substanzen kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie z.B. als pharmazeutische Wirkstoffe, z.B. zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, verwendet werden können.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

٨L	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxenburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco .	TD	Techad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
rj	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Ralien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KB	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugosławien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	K2	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	u	Liechtenstein	SID	Sudan		
DK	Dånemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		

r. attorial Application No PCT/EP 99/09234

				rui/er	99/09234
1PC 7	C1201/68 C07K14/47 C1201/68 C07K14/47 C12N15/81 C12N15/83	C12N15/12 G01N33/68	C12N15/	10 C	12N5/10
According to	International Patent Classification (IPC) or to both	national dassification	and IPC		
	SEARCHED				
IPC 7	cumentation searched (classification system follow C12Q C12N C07K G01N	ed by classification s	mbols)		
	ion searched other than minimum documentation to				
	ata base consulted during the international search , EPO-Internal , WPI Data, f				
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appr	opnide, of the relevan	t passages		Relevant to claim No.
Υ	EP 0 653 154 A (HOECHST 17 May 1995 (1995-05-17) * see especially SEQ ID and SEQ ID NO:9 (page 15 abstract; claims 1-10	NO:2 (page			1-10, 12-14, 16-20, 23,25, 31,32, 34, 37-39,41
X Furt	her documents are listed in the continuation of box	с. [х	Patent family i	members are	listed in annex.
"A" docum consists earlier tiling "L" docum which critatik "O" docum "P" docum later "Date of the	ent defining the general state of the art which is not bened to be of particular relevance document but published on or after the international table and which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another in or other special reason (as specified) and referring to an oral disclosure, use, exhibition of means explained prior to the international filing date but han the priority date claimed actual completion of the international search		cited to understant invention document of particu cannot be conside involve an inventiv document of particu cannot be conside document is comb	differential distribution of the same p the internation of the same p the internation	
	mailing address of the ISA European Petent Office, P.B. 5818 Patentiaan NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fatt. (+31-70) 340-2040.	2	Authorized officer Knehr		

Form PCT//SA/210 (second sheet) (July 1992)

In: Itional Application No
PCT/EP 99/09234

regory ,	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	LINK C D: "TRANSGENIC CAENORHABDITIS ELEGANS AS MODEL SYSTEM TO STUDY AMYLOID FORMATION AND TOXICITY" NEUROBIOLOGY OF AGING, US, TARRYTOWN, NY, vol. 15, no. SUPPL. 01, 29 July 1994 (1994-07-29), page S33 XP002065640 ISSN: 0197-4580	1-3,7-9, 11,13, 14,16, 17,25, 31,32, 34, 36-39, 41,44, 46-50
	abstract	
1	WO 94 28412 A (MIRIAM HOSPITAL) 8 December 1994 (1994-12-08) * see especially claim 5 * the whole document	1-4,31, 32, 45-47,50
1	WOLFE M S ET AL.: "A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 41, 1998, pages 6-9, XP000938942 page 6, column 1, paragraph 1 -page 7, column 1, paragraph 1; figure 1	1-3,31, 32,45-47
Y	URMONEIT B ET AL: "Cationic Lipids (Lipofectamine) and Disturbance of Cellular Cholesterol and Sphingomyelin Distribution Modulates Gamma-Secretase Activity Within Amyloid Precursor Protein In Vitro - An index of oxidative stress" PROSTAGLANDINS AND OTHER LIPID MEDIATORS,US,BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, vol. 55, no. 5-6, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 331-343, XP004128238 ISSN: 0090-6980 the whole document	1-3,9-12
Y	WO 98 15828 A (SCIOS INC ;CORDELL BARBARA (US); HIGAKI JEFFREY N (US)) 16 Apr11 1998 (1998-04-16) the whole document	1-3, 44-49
Y	CUBITT A B ET AL: "UNDERSTANDING, IMPROVING AND USING GREEN FLUORESCENT PROTEINS" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, EN, ELSEVIER PUBLICATION, CAMBRIDGE, vol. 20, 1 November 1995 (1995-11-01), pages 448-455, XP000606919 ISSN: 0968-0004 the whole document	1,18, 21-23, 45,46

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

In itional Application No PCT/EP 99/09234

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SADOWSKI I ET AL.: "GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator" NATURE, vol. 335, 1988, pages 563-564, XP002147306 cited in the application the whole document	1,19-22
A	EP 0 801 307 A (CHUGAI BIOPHARMACEUTICALS INC) 15 October 1997 (1997-10-15) * see especially SEQ ID NO:6 (pages 27-32) * abstract	
A	US 5 667 992 A (CASEY JAMES M ET AL) 16 September 1997 (1997-09-16) * see especially SEQ ID NO:5 * abstract column 103 -column 112	
A	HIGAKI J ET AL.: "Processing of beta-amyloid precursor protein by cathepsin D" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 50, 1996, pages 31885-31893, XP002147307 the whole document	
Р, Ү	LICHTENTHALER S F ET AL.: "A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase" FEBS LETTERS, vol. 453, 1999, pages 288-292, XP000937693 the whole document	1-3,5-9, 11,17, 18,25, 31,32, 34,36, 38,45-47
P,Y	LI, Q-X ET AL.: "Intracellular accumulation of detergent-soluble amyloidogenic Abeta fragment of Alzheimer's disease precursor protein in the hippocampus of aged transgenic mice" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 72, 1999, pages 2479-2487, XP000912279 abstract page 2480, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 1; figure 1	1-3,5-9, 11,17, 18,25, 31,32, 34,36, 38,45-47
E	DE 198 49 073 A (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMB) 27 April 2000 (2000-04-27) cited in the application the whole document	31-42,44

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

In. total Application No PCT/EP 99/09234

	nt document search report		Publication date		atent family nember(s)	Publication date
EP 0	653154	Α	17-05-1995	JP	7132033 A	23-05-1995
				CA	2135595 A	13-05-1995
				US	6037521 A	14-03-2000
WO 9	428412	A	08-12-1994	AU	7043894 A	20-12-1994
WO 9	815828	A	16-04-1998	AU	4589297 A	05-05-1998
EP 0	801307	A	15-10-1997	US	5866341 A	02-02-1999
				AU	717289 B	23-03-2000
				AU	2661997 A	22-10-1997
	· 			MO	9737220 A	09-10-1997
US 5	667992	A	16-09-1997	US	5854001 A	29-12-1998
				AU	3604993 A	01-09-1993
				CA	2129733 A	01-08-1993
				EP	0627000 A	07-12-1994
				JP	7503614 T	20-04-1995
				WO	9315193 A	05-08-1993
DE 1	9849073	Α	27-04-2000	AU	6090799 A	15-05-2000
				WO	0024880 A	04-05-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family ennex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT Jonales Aktenzeichen PCT/EP 99/09234 A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES 1PK 7 C12Q1/68 C07K14/47 C12N15/12 C12N15/10 C12N5/10 C12N15/81 C12N15/83 G01N33/68 Nach der internationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestcrüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C120 C12N C07K G01N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der Internationalen Recherche konsuttlerte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegnife) STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kategorie* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teite Betr. Anspruch Nr. EP 0 653 154 A (HOECHST JAPAN) 17. Mai 1995 (1995-05-17) Y 1-10, 12-14, 16-20, 23,25, 31,32, 34, 37-39,41 * see especially SEQ ID NO:2 (page 10-11) and SEQ ID NO:9 (page 15) * Zusammenfassung; Ansprüche 1-10 -/--Weitere Veröffentlichungen eind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen X Siehe Anhang Patentfamille * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritästektun veröfentlicht worden ist und mit der Anmekung nicht kollidiert, sondern unz zum Verständnas des der Erfindung zugundellegenden Prinzips oder der ihr zugrundellegenden Theorie angegoben ist "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik deliniert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen. Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderbecher Tätigkat beruhand betrachtel werden 1.º Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zwedelhalt er-schamen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf eifinderischer Täligkeit beruhend betrachtet werden, wern die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategone in Veröffentlichungen dieser Kategone in Veröffentlichungen dieser Kategone in Veröffentlichungen dieser Veröffentlichung für einer Fachtramn nahebagend ist werden. soil oder die aus einem enceren besonderen Grund angegeben ist (we ausgeführt).

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenberung, eine Berutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeidadatum, aber nach dem Deanspruchten Prichtiläsdatum veröffentlich worden ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts 13. September 2000 25/09/2000 Name und Postanachuft der Internationalen Recherchenbehörne. Bevollmächtigter Bediensteter Europäischee Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (431–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax: (431–70) 340–3016

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Jul 1992)

1

Knehr, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionales Aktenzeichen PCT/EP 99/09234

Bezeichnung der Veröttentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Te	te Betr. Anspruch Nr.
LINK C D: "TRANSGENIC CAENORHABDITIS ELEGANS AS MODEL SYSTEM TO STUDY AMYLOID FORMATION AND TOXICITY" NEUROBIOLOGY OF AGING,US,TARRYTOWN, NY, Bd. 15, Nr. SUPPL. 01, 29. Juli 1994 (1994-07-29), Seite S33 XP002065640 ISSN: 0197-4580	1-3,7-9, 11,13, 14,16, 17,25, 31,32, 34, 36-39, 41,44, 46-50
WO 94 28412 A (MIRIAM HOSPITAL) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) * see especially claim 5 * das ganze Dokument	1-4,31, 32, 45-47,50
WOLFE M S ET AL.: "A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 41, 1998, Seiten 6-9, XP000938942 Seite 6, Spalte 1, Absatz 1 -Seite 7, Spalte 1, Absatz 1; Abbildung 1	1-3,31, 32,45-47
URMONEIT B ET AL: "Cationic Lipids (Lipofectamine) and Disturbance of Cellular Cholesterol and Sphingomyelin Distribution Modulates Gamma-Secretase Activity Within Amyloid Precursor Protein In Vitro - An index of oxidative stress" PROSTAGLANDINS AND OTHER LIPID MEDIATORS,US,BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, Bd. 55, Nr. 5-6, 1. April 1998 (1998-04-01), Seiten 331-343, XP004128238 ISSN: 0090-6980 das ganze Dokument	1-3,9-12
WO 98 15828 A (SCIOS INC ;CORDELL BARBARA (US); HIGAKI JEFFREY N (US)) 16. April 1998 (1998-04-16) das ganze Dokument	1-3, 44-49
CUBITT A B ET AL: "UNDERSTANDING, IMPROVING AND USING GREEN FLUORESCENT PROTEINS" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, EN, ELSEVIER PUBLICATION, CAMBRIDGE, Bd. 20, 1. November 1995 (1995-11-01), Seiten 448-455, XP000606919 ISSN: 0968-0004	1,18, 21-23, 45,46
	LINK C D: "TRANSGENIC CAENORHABDITIS ELEGANS AS MODEL SYSTEM TO STUDY AMYLOID FORMATION AND TOXICITY" NEUROBIOLOGY OF AGING, US, TARRYTOWN, NY, Bd. 15, Nr. SUPPL. 01. 29. Juli 1994 (1994-07-29), Seite S33 XPO02065640 ISSN: 0197-4580 ZUSAMMENFASSUNG WO 94 28412 A (MIRIAM HOSPITAL) B. Dezember 1994 (1994-12-08) * see especially claim 5 * das ganze Dokument WOLFE M S ET AL.: "A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 41, 1998, Seiten 6-9, XPO00938942 Seite 6, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 7, Spalte 1, Absatz 1; Abbildung 1 URMONEIT B ET AL: "Cationic Lipids (Lipofectamine) and Disturbance of Cellular Cholesterol and Sphingomyelin Distribution Modulates Gamma-Secretase Activity Within Amyloid Precursor Protein In Vitro - An index of oxidative stress" PROSTAGLANDINS AND OTHER LIPID MEDIATORS, US, BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, Bd. 55, Nr. 5-6, 1. April 1998 (1998-04-01), Seiten 331-3343, XPO04128238 ISSN: 0090-6980 das ganze Dokument WO 98 15828 A (SCIOS INC; CORDELL BARBARA (US); HIGAKI JEFFREY N (US)) 16. April 1998 (1998-04-16) das ganze Dokument CUBITT A B ET AL: "UNDERSTANDING, IMPROVING AND USING GREEN FLUORESCENT PROTEINS" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, EN, ELSEVIER PUBLICATION, CAMBRIDGE, Bd. 20, 1. November 1995 (1995-11-01), Seiten 448-455, XPO00606919

Formblatt PCT//SA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In .tionales Aktenzeichen PCT/EP 99/09234

ategorie'	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr, Anspruch Nr.
Y	SADOWSKI I ET AL.: "GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator" NATURE, Bd. 335, 1988, Seiten 563-564, XP002147306 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,19-22
A	EP 0 801 307 A (CHUGAI BIOPHARMACEUTICALS INC) 15. Oktober 1997 (1997-10-15) * see especially SEQ ID No:6 (pages 27-32) * Zusammenfassung	
Α	US 5 667 992 A (CASEY JAMES M ET AL) 16. September 1997 (1997-09-16) * see especially SEQ ID NO:5 * Zusammenfassung Spalte 103 -Spalte 112	
A	HIGAKI J ET AL.: "Processing of beta-amyloid precursor protein by cathepsin D" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 271, Nr. 50, 1996, Seiten 31885-31893, XP002147307 das ganze Dokument	
P,Y	LICHTENTHALER S F ET AL.: "A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase" FEBS LETTERS, Bd. 453, 1999, Seiten 288-292, XP000937693 das ganze Dokument	1-3,5-9 11,17, 18,25, 31,32, 34,36, 38,45-47
P,Y	LI, Q-X ET AL.: "Intracellular accumulation of detergent-soluble amyloidogenic Abeta fragment of Alzheimer's disease precursor protein in the hippocampus of aged transgenic mice" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, Bd. 72, 1999, Seiten 2479-2487, XP000912279 Zusammenfassung Seite 2480, Spalte 1, Absatz 4 -Spalte 2, Absatz 1; Abbildung 1	1-3,5-9, 11,17, 18,25, 31,32, 34,36, 38,45-47
E	DE 198 49 073 A (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMB) . 27. Apr11 2000 (2000-04-27) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	31-42,44

Formblett PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blutt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen die zur helben Palentfamilie gehören

In :ionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/09234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mil	tglied(er) der atentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0653154	A	17-05-1995	JP CA US	7132033 A 2135595 A 6037521 A	23-05-1995 13-05-1995 14-03-2000
WO 9428412	Α	08-12-1994	AU	7043894 A	20-12-1994
WO 9815828	A	16-04-1998	AU	4589297 A	05-05-1998
EP 0801307	A	15-10-1997	US AU AU WO	5866341 A 717289 B 2661997 A 9737220 A	02-02-1999 23-03-2000 22-10-1997 09-10-1997
US 5667992	A	16-09-1997	US AU CA EP JP WO	5854001 A 3604993 A 2129733 A 0627000 A 7503614 T 9315193 A	29-12-1998 01-09-1993 01-08-1993 07-12-1994 20-04-1995 05-08-1993
DE 19849073	A	27-04-2000	AU WO	6090799 A 0024880 A	15-05-2000 04-05-2000

Formbiatt PCT/ISA/210 (Anhang Patenttemille)(Juli 1992)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
 □ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 □ FADED TEXT OR DRAWING
 □ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
 □ SKEWED/SLANTED IMAGES
 □ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
 □ GRAY SCALE DOCUMENTS
 □ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
 □ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.